

URAD REPUBLIKE SLOVENIJE ZA INTELEKTUALNO LASTNINO

P o t r d i l o
C e r t i f i c a t e

REC'D 03 JAN 2005

WIPO PCT

Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino potrjuje, da je priloženi dokument istoveten z izvirnikom patentne prijave, kot sledi:

Slovenian Intellectual Property Office hereby certifies that the document annexed hereto is a true copy of the patent application, as follows:

(22) Datum prijave (*Application Date*):

23.12.2003 (23.dec.2003)

(21) Številka prijave (*Application No.*):

P-200300318

(54) Naziv (*Title*):

Farmacevtski pripravek, ki vsebuje nemicelarne sulfobetaine

Za izdajo tega potrdila je bila plačana taksa v višini 255,00 SIT po prvi alinei tarifne številke 4 taksne tarife Zakona o upravnih taksah (Uradni list RS, št. 8/00 in nadaljnji).

Ljubljana, 28.12.2004



Janez Milač
višji svetovalec II



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

ZAHTEVA ZA PODELITEV PATENTA

1. Naslov za obvešanje:

Lek farmacevtska družba d.d.
Verovškova 57
1000 Ljubljana

tel.: 580 20 05
faks: 568 21 23

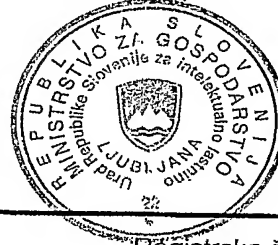
šifra: 33581/SI/BKU

Potrdilo o prejemu prijave (izpolni urad)

Datum vložitve prijave: 23.12.2003

Številka prijave: P-200300318

Žig urada in podpis:



Registrska številka:

2. Prijavitelj (priimek, ime in naslov, za pravne osebe firma in sedež):

Lek farmacevtska družba d.d.
Verovškova 57
1000 Ljubljana

3. Zastopnik:

4. Izumitelj (priimek, ime in naslov):

Menart Viktor, Dol 3, 1370 Logatec

5. Naziv izuma:

Farmacevtski pripravek, ki vsebuje nemicelarne sulfobetaine

6. Podatki o zahtevani prednostni pravici in podlagi zanjo:

7. Dodatne zahteve:

- ☐ prijava je za patent s skrajšanim trajanjem
- ☐ predhodna objava patenta po preteku ____ mesecev
- ☐ prijava je izločena iz prijave številka:

8. Izjava:

- ☐ izjava o skupnem predstavniku:

9. Priloge:

- ☒ opis izuma, ki ima 17 strani 2x
- ☒ patentni zahtevki (zahtevki), ki ima(jo) 2 strani; število zahtevkov: 16 2x
- ☒ skice (če so zaradi opisa izuma potrebne); število listov: 2 2x
- ☒ povzetek 2x
- ☐ potrdilo o plačilu prijavnih pristojbin
- ☐ potrdilo o deponiranju biološkega materiala, če gre za izum, ki ga ni mogoče drugače opisati
- ☐ pooblastilo zastopniku
- ☐ generalno pooblastilo zastopniku je deponirano pri uradu pod št.: _____
- ☐ potrdilo o razstavi prednostni pravici
- ☒ podatki o drugih prijaviteljih
- ☒ podatki o drugih izumiteljih
- ☐ prikaz zaporedja nukleotidov ali aminokislin v opisu
- ☒ prijava je bila predhodno posredovana po faksu ali v elektronski obliki
- ☐

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA GOSPODARSTVO
URAD RS ZA INTELEKTUALNO LASTNINO

Prejeto dne: 23-12-2003

Osebnostna oddaja: ☐

Priloge: _____

Šifra: _____

Oddano priporočeno dne: _____

Poštna številka: 13382

Podatki o drugih izumiteljih:

Gaberc Porekar Vladka
Vrhovci c. X/43
1000 Ljubljana

Podobnik Barbara
Pod ježami 10
1000 Ljubljana

Naziv izuma

Farmacevtski pripravek, ki vsebuje nemicelarne sulfobetaine

Področje tehnike

Predloženi izum se nanaša na farmacevtski pripravek, ki vsebuje nemicelarne sulfobetaine (NDSB).

Stanje tehnike

Farmacevtski pripravki, ki vsebujejo aktivne farmacevtske učinkovine, so opisani v obsežni znanstveni in patentni literaturi. Opisani farmacevtski pripravki vsebujejo različne farmacevtsko sprejemljive ekscipiente, ki z različnimi lastnostmi (npr. stabilizacija aktivne farmacevtske učinkovine, vzpostavljanje in/ali vzdrževanje pH, vpliv na topnost aktivne farmacevtske učinkovine, vzdrževanje izotoničnosti farmacevtskega pripravka itd.) omogočajo uporabo aktivnih farmacevtskih učinkovin v farmacevtskih pripravkih. Farmacevtsko sprejemljivi ekscipienti so obsežno opisani v znanstveni in patentni literaturi, kot je npr. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Ainley Wade in Paul J. Weller, American Pharmaceutical Association, 1994.

V znanstveni in patentni literaturi so obsežno opisani tudi farmacevtski pripravki, ki vsebujejo kot aktivne farmacevtske učinkovine terapevtsko učinkovite proteine. Ti farmacevtski pripravki prav tako vsebujejo različne farmacevtske ekscipiente, ki s svojimi lastnostmi omogočajo pripravo stabilnih farmacevtskih pripravkov, ki vsebujejo terapevtsko učinkovite proteine. Taki farmacevtski pripravki so obsežno opisani v znanstveni in patentni literaturi, kot npr. v: Yu-Chang John Wang and Musetta A. Hanson (1988) J of Parenteral Science & Technology, 42: S4-S26; Wong D. and Parasrampur J. (1997), Biopharm: November 52-61.

Stabilni farmacevtski pripravki, ki vsebujejo terapevtski protein granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF), so opisani v EP 373679 in so opisani s tem, da predvsem stabilizirajo G-CSF pri nizkih prevodnostih in pri kislem pH med 2.75 to 4.0. Za izboljšano stabilnost so dodani različni sladkorji, aminokisline, polimeri in

detergenti. Predvsem je poudarjeno, da mora biti pH pripravka, ki vsebuje G-CSF, manj kot 4, da se zmanjša tvorba agregatov in s tem poveča stabilnost. Tvorba agregatov in znižana stabilnost pri pH nad 4.0 sta v skladu s podatki iz literature iz stanja tehnike (Kuzniar *et al* (2001) *Pharm Dev Technol* 6(3):441-7; Bartkowski *et al* (2002) *J Protein Chem* 21(3):137-43; Narhi *et al* (1991) *J Protein Chem* 10(4): 359-367; Wang W (1999) *Int J Pharmaceut* 185:129-188.

G-CSF stabilnost, opisana v drugih farmacevtskih pripravkih iz patentne in znanstvene literature, je dosežena z dodatki različnih stabilizatorjev, kot so npr.: sulfatni ioni (EP 1129720), mešanica različnih konzervansov, aminokislin in surfaktantov (EP 607156), različni puferski sistemi (fosfatni, citratni, argininski, acetatni) v prisotnosti surfaktanta (EP 674525), visoko molekularne spojine, kot so hidroksipropil celuloza, polietilenglikol, polivinil alkohol, polivinilpirolidon in druge (GB 2193621), surfaktant (EP 1060746), različni puferski sistemi (TRIS, HEPES, TRICINE) (EP 0988861), sladkorji, kot so celobioza, gentiobioza, izomaltoza, rafinoza, trehaloza in drugi (EP 0674524) in ena ali več aminokislin (EP 1197221, WO51629, EP 1260230 in EP 1329224, EP 0975335). Čeprav je nizka ionska moč preferenčna za farmacevtske pripravke, ki vsebujejo G-CSF, so v večini primerov v patentni in znanstveni literaturi iz stanja tehnike uporabili različne surfaktante in ostale stabilizatorje za stabilizacijo G-CSF. Poleg le-teh so v večini primerov dodatno uporabili različne puferske sisteme za vzdrževanje pH.

V literaturi je opisana uporaba NDSB kot solubilizatorjev (v višjih koncentracijah: okoli 1 M raztopine) pri renaturacijah proteinov (Chong Y in Chen H. (2000) *Biotechniques* 29(6):1166-7; Vuillard L *et al* (1995) *Biochem J* 305: 337-43; Vuillard L *et al* (1995) *Electrophoresis* 16(3): 295-7; Vuillard L *et al* (1998) *Eur J Biochem* 256: 128-135; Goldberg M E *et al* (1995) *Folding & Design* 1: 21-27).

Ne v strokovni ne v patentni literaturi ne zasledimo opisa uporabe NDSB v farmacevtskih pripravkih.

Opis slik

Slika 1: SE-HPLC inventivnih vzorcev in referenčnega vzorca, shranjenih pri 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) 1 mesec (40).

Slika 2: SE-HPLC inventivnih vzorcev, shranjenih pri 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) 1 mesec (40).

Opis izuma

Predloženi izum se nanaša na farmacevtski pripravek, ki vsebuje NDSB.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, med drugim vsebuje naslednje komponente:

- a. terapevtsko učinkovito količino aktivne farmacevtske učinkovine in
- b. NDSB.

Z izrazom 'terapevtsko učinkovita količina aktivne farmacevtske učinkovine' je mišljena aktivna farmacevtska učinkovina v količini, ki ima terapevtski učinek. Aktivna farmacevtska učinkovina je v smislu izuma izbrana iz skupine, ki zajema sintetske ali naravne organske molekule, med drugim v vodi slabo topne sintetske in naravne organske molekule; proteine, med drugim v vodi slabo topne in/ali hidrofobne proteine in/ali druge aktivne farmacevtske učinkovine, ki imajo terapevtski učinek. Prednostno se kot aktivne farmacevtske učinkovine uporabljajo terapevtsko učinkoviti proteini.

Z izrazom 'terapevtsko učinkoviti protein' je mišljen protein, ki ima terapevtski učinek. Proteini, ki se uporabljajo v farmacevtskem pripravku, ki je predmet izuma, so izbrani iz skupine, ki med drugim zajema: granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF), interferone (IFN); kot so IFN alfa2a, INF-alfa 2b, IFN-beta, IFN-gama 1b; interleukine (IL), kot so IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 do IL-10; granulocitni makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF); makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik (M-CSF); epidermalni rastni faktor (EGF); eritropoietin (EPO); folikle-stimulirajoči hormon (FSH); humani serumski albumin (HSA); deoksiribonukleazo (DNAza); fibroblastni rastni faktor (aFGF ali bFGF); dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF alfa)

in dejavnik tumorske nekroze beta (TNF-beta); kalcitonin; hematoprotein; plazminogenske aktivatorje in njihove prekurzorje (t-PA, urokinaza, pro- urokinaza, streptokinaza, Protein C); citokine; družino TNF ligandov (TRAIL, FasL, osteoprotegerin); topne receptorje (p55, p75), rastni hormon, med drugim humani rastni hormon, goveji rastni hormon, paratiroidni hormon; lipoproteine; alfa-1-antitripsin; insulin, proinsulin, podenoto A insulina, podenoto B insulina; glukagone; faktorje strjevanja krvi, kot npr. Faktor VIII, Faktor IX, tkivni faktor, von Willebrandov faktor; bombazin; trombin; enkefalinazo; makrofagni inflamatorni protein (MIP-1-alfa); podenota A relaksina, podenota B relaksina, prorelaksin; inhibin; aktivin; vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF); receptorje za hormone ali rastne faktorje; integrine; protein A, protein D; reumatoidne faktorje; neurotropni faktor iz kosti (BDNF), neurotropin-3,-4,-5, ali -6; živčni rastni faktor (NGF); rastni faktor iz krvnih ploščic (PDGF); fibroblastni rastni faktor (aFGF in bFGF); transformirani rastni faktor (TGF-alpha in TGF-beta); insulinu-podobni rastni faktor (IGF1 and IGF2); trombopoietin (TPO); kostni morfogenetski protein (BMP); superoksid dismutaza; biološko aktivne fragmente zgoraj naštetih proteinov in druge terapevtske učinkovite proteine.

Terapevtsko učinkoviti proteini se v smislu izuma uporabljajo v terapevtsko učinkovitih količinah.

Z izrazom 'terapevtsko učinkovita količina proteinov' je mišljena tista količina proteina, ki ima terapevtski učinek.

Pri uporabi terapevtsko učinkovitega proteina vsebuje farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, vsaj naslednje komponente:

- c. terapevtsko učinkovito količino proteina in
- d. NDSB.

Najbolj prednostno se kot aktivna farmacevtska učinkovina uporablja terapevtsko učinkovita količina G-CSF. Pri uporabi G-CSF vsebuje farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, vsaj naslednje komponente:

- e. terapevtsko učinkovito količino G-CSF in
- f. NDSB.

Z izrazom 'G-CSF' je mišljen protein, ki regulira diferenciacijo in proliferacijo hematopoetskih celic sesalcev ter aktivacijo zrelih celic hematopoetskega sistema. Izbran je iz skupine, ki zajema humani G-CSF ter njegove derivate in analoge, ki so definirani spodaj. Prednostno se G-CSF nanaša na rekombinantni humani G-CSF, ki je pridobljen z ekspresijo v bakteriji *E. coli*.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, se lahko uporablja za vse vrste G-CSF, med drugim se lahko uporablja tudi v primeru izolacije derivatiziranih oblik G-CSF, kot so: metionil G-CSF (Met-G-CSF), glikozilirani, encimsko in kemijsko modificirani (kot npr.: pegilirani) G-CSF, G-CSF analogi in fuzijski proteini, ki vsebujejo G-CSF.

Z izrazom 'terapevtsko učinkovita količina G-CSF' je mišljena tista količina G-CSF, ki omogoča terapevtski učinek G-CSF.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, opcijsko dodatno vsebuje:

- g. poliol in/ali
- h. eno ali več drugih farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi.

Z izrazom 'poliol' je mišljen katerikoli polihidrični alkohol, to je kemijska spojina, ki vsebuje eno ali več hidroksilnih skupin na molekulo.

Čeprav farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, ni omejen v tej smeri, lahko vsebuje le komponenti a.-b ali le komponenti c.-d. ali le komponenti e.-f. Opcijsko lahko dodatno vsebuje tudi komponente g in/ali h. Tako lahko farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, vsebuje komponente a.-b.+g ali a.-b.+h ali a.-b.+g-h ali c.-d.+g ali c.-d.+h ali c.-d.+g-h ali e.-f.+g ali e.-f.+h ali e.-f.+g-h.

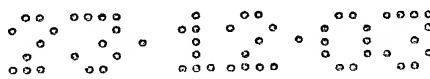
Z izrazom 'stabilizator' je mišljena farmacevtsko sprejemljiva pomožna snov, ki stabilizira protein (npr. G-CSF).

Z izrazom 'stabilnost proteina (npr. G-CSF)' je mišljeno tako ohranjanje vsebnosti proteina (npr. G-CSF) kot tudi ohranjanje biološke aktivnosti proteina (npr. G-CSF). K zmanjšanju stabilnosti proteina (npr. G-CSF) prispevajo med drugim naslednji procesi: adsorpcija proteina na stene ovojnine, denaturacija ali razgradnja proteina in

tvorba agregatov, npr. proteinska dimera (npr. G-CSF dimera) in/ali proteinska multimeri (npr. G-CSF multimeri) in/ali sorodnih molekul z večjo molekulsko maso. Ti procesi so lahko posledica različnih dejavnikov, med drugim povišane temperature, neprimerne ovojnine, uporabe neprimernih stabilizatorjev proteinov, sončne svetlobe, zamrzovanja/odtajanja, neprimernega postopka izdelave in/ali neprimernega postopka shranjevanja.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, stabilizira protein (npr. G-CSF) pri temperaturah, ki so višje od temperature hladilnika (2-8°C), pa tudi pri sobni temperaturi in pri višjih temperaturah (na primer okoli 40°C).

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, lahko vsebuje za stabilizacijo proteina (npr. G-CSF) in za vzdrževanje primerne pH raztopine le eno farmacevtsko sprejemljivo snov, to je NDSB. NDSB v farmacevtskem pripravku predstavlja tako zaščitno molekulo, ki stabilizira protein in s tem nadomesti stabilizatorje proteinov, ki se uporabljajo v drugih farmacevtskih pripravkih (npr. sladkorje, aminokisline in druge), kot tudi molekulo, ki ustvari primeren pH raztopine in s tem nadomesti kisline (npr. očetna, citronska, metansulfonska, fosforna, solna in druge), ki se uporabljajo za ustvarjanje primerne pH raztopin v drugih farmacevtskih pripravkih. NDSB lahko ustvarjeni primerni pH tudi vzdržuje in s tem nadomesti različne pufrske sisteme in/ali njihove kombinacije, ki se uporabljajo v drugih farmacevtskih pripravkih (npr. očetna kislina/acetat, glutaminska kislina/glutamat, maleinska kislina/maleat, citronska kislina/citrat, fosforna kislina/fosfat in druge). V primerjavi z uporabo dveh ali več molekul z različnimi funkcijami, je uporaba ene molekule z več različnimi funkcijami boljša v smislu ekonomičnosti priprave, manjših stroškov, pa tudi v smislu lažje in manj zamudne priprave farmacevtskega pripravka, pa tudi za bolnika v smislu vnosa manj dodatnih snovi v organizem. Dodatno prednost predstavljajo lastnosti NDSB, saj je to enostavna molekula, ki je neobčutljiva na svetlobo, temperaturo, različne oksidante (npr. zračni kisik), hidrolizo, ni kemijsko reaktivna molekule, ima zwitter-ionski značaj v širokem področju pH, kar pomeni da se mehanizem interakcije v širokem področju pH bistveno ne spremeni.



Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, je tekoči farmacevtski pripravek, kar pa ne omejuje uporabe NDSB v liofiliziranih farmacevtskih pripravkih, ki vsebujejo proteine.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, omogoča parenteralno aplikacijo in sicer subkutano, intravenozno ali intramuskularno aplikacijo, brez rekonstitucije, redčenja ali dodatnih predpriprav, ki bi lahko prispevale k zmanjšanju aktivnosti G-CSF kot tudi k dodatnim tehničnim težavam pri uporabi.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, ne vsebuje humanih serumskih proteinov, pri katerih je mogoča okužba z virusi. Prav tako je s tem zmanjšana verjetnost za pojav raznih alergijskih reakcij, ki bi bile lahko posledica uporabe humanih serumskih albuminov. Pripravljen je v izotonični raztopini, ki je farmacevtsko sprejemljiva in ne povzroči stranskih učinkov.

V farmacevtskem pripravku, ki je predmet izuma, terapevtsko učinkovita količina proteina ustreza terapevtsko učinkovitim količinam proteina, ki so dosegljive na trgu. V primeru uporabe G-CSF je terapevtsko učinkovita količina G-CSF izbrana v območju med 0.3 mg/ml in 1.2 mg/ml, kar pa ne omejuje predloženega izuma.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, vsebuje nemicelarne sulfobetaine (NDSB).

Z izrazom 'nemicelarni sulfobetaini' so mišljeni sulfobetaini, ki v vodni raztopini ne tvorijo micel (ne glede na kemijsko strukturo skupin R1, R2, R3 ali R4-SO₃⁻). Izraz 'nemicelarni sulfobetain' je v smislu izuma zamenljiv s kratico 'NDSB' in je v smislu izuma enak slovenskemu prevodu angleške besede 'non-detergent sulphobetaine'. Navedeni sulfobetaini so kvarterne amonijeve soli, kjer so na centralni dušik vezane skupine R1, R2, R3 in R4-SO₃⁻, pri čemer je:

R1 = metil, etil, propil, butil, pentil, heksil;

R2 = metil, etil, propil, butil, pentil, heksil;

R3 = metil, etil, propil, butil, pentil, heksil.

Uporabljajo se lahko vse kombinacije treh radikalov R1, R2 in R3;

R4 = (CH₂)_n, n = od 1 do 6; najbolj prednostno n=3.

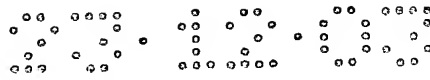


Prednostno se v farmacevtskem pripravku, ki je predmet izuma, uporabljajo nemicelarni sulfobetaini izbrani iz skupine, ki zajema nemicelarne sulfobetaine: dimetiletil-(3-sulfopropil)-amonijeva sol (SB195), 3-(1-metilpiperidin)-1-propan sulfonat (SB221), 3-(1-piridino)-1-propan sulfonat (SB201), dimetilbenzilamonijev propan sulfonat (SB256) in dimetil-t-butil-(3-sulfopropil) amonijevo sol (SB222t). Najbolj prednostno se uporabljajo SB222t, SB195 in SB221.

Uporabljena koncentracija NDSB je odvisna od pH, ki ga želimo ustvariti in/ali vzdrževati. Izbrana je v območju med 1 in 1000 mM, preferenčno od 10 do 100 mM. pH farmacevtskega pripravka, ki je predmet izuma, je lahko v območju med 2 in 9, prednostno med 3 in 8, najbolj prednostno 3,5 - 7,5.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, opsijsko dodatno vsebuje stabilizator poliol, ki je izbran iz skupine, ki zajema sorbitol, glicerol, inozitol, trehalozo in manitol. Koncentracija poliola je prednostno v območju med 1% in 10% (m/v), najbolj prednostno med 3% in 6% (m/v).

Farmacevtski pripravek opsijsko dodatno vsebuje eno ali več farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi, izbranih iz skupine, ki zajema lovilce kovinskih kationov (npr. EDTA in podobni kelatorji), topila in lovilce prostih radikalov (npr. DMSO), razne kisline (npr. očetna, citronska, metansulfonska, fosforna, solna in druge), različne baze (npr. NaOH ali organske N-baze, npr. Good-ovi pufri, kot so TRIS, TES, HEPES), različne pufrske sisteme (npr. očetna kislina/acetat, glutaminska kislina/glutamat, maleinska kislina/maleat, citronska kislina/citrat, fosforna kislina/fosfat in druge), različne farmacevtsko sprejemljive pomožne snovi za vzdrževanje izotoničnosti raztopine (npr. anorganske soli, kot sta CaCl_2 in NaCl). Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma opsijsko dodatno vsebuje enega ali več stabilizatorjev proteinov, izbranih iz skupine, ki zajema površinsko aktivne snovi, kot so: glikol in glicerol estri, makrogol estri in etri, sorbitan derivati oz. polisorbati (polisorbat 20, polisorbat 80), aminokisline, poloksameri (Pluronic F68), polivinilpirolidon (PVP) in druge.

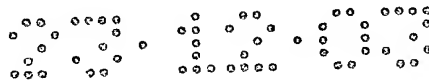


Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, se lahko uporablja za zdravljenje indikacij ter za pripravo zdravil, ki so indicirana za indikacije, izbrane iz skupine, ki vključuje vsaj: nevtropenijo in njene klinične sekvele, zmanjšanje hospitalizacije pri febrilni nevtropeniji po kemoterapiji, mobilizacijo hematopoetskih zarodnih celic, alternativo infuziji donorskih levkocitov, kronično nevtropenijo, nevtropenične in nenevtropenične infekcije, prejemnike transplatatov, kronična vnetna obolenja, sepso in septični šok, zmanjšanje tveganja, obolevnosti, smrtnosti in števila dni hospitalizacije pri nevtropeničnih in nenevtropeničnih infekcijah, prewencijo infekcij in komplikacij infekcij pri nevtropeničnih in nenevtropeničnih bolnikih, prewencijo nozokomialne infekcije in zmanjšanje mortalitete in frekvence nozokomialnih infekcij, enteralno aplikacijo novorojenčkom, okrepitev imunskega sistema novorojenčkov, izboljšanje kliničnega izida bolnikov na intenzivni negi in kritično bolnih bolnikov, celjenje in zdravljenje opeklin, kožnih ulkusov in ran, intenzifikacijo kemoterapije in/ali radioterapije, pancitopenijo, povečanje anti-inflamatornih citokinov, skrajšanje intervalov visokodozne kemoterapije s profilaktično uporabo G-CSF, potenciranje anti-tumorskih učinkov fotodinamske terapije, prewencijo in zdravljenje bolezni, ki jih povzročajo različne cerebralne disfunkcije, zdravljenje trombotičnih bolezni in njihovih komplikacij in postradiacijsko obnovo eritropoeze. Uporablja se lahko tudi pri vseh drugih boleznih, za katere so indicirani G-CSF.

Uporablja se lahko tudi za pripravo zdravil (za zdravljenje) in za zdravljenje drugih bolezni, za katere so indicirani drugi terapevtsko učinkoviti proteini, ki so naštetih zgoraj.

Farmacevtski pripravek, ki je predmet izuma, je polnjen v farmacevtsko ovojnino, izbrano iz skupine, ki zajema ampule, injekcijske brizge in vial. Te farmacevtske ovojnine omogočajo aplikacijo v območju volumna med 0.2 ml in 2 ml (doza).

Nadalje je predmet izuma tudi postopek za pripravo farmacevtskega pripravka v smislu izuma. Postopek za pripravo farmacevtskega pripravka v smislu izuma zajema mešanje NDSB s terapevtsko učinkovito količino aktivne farmacevtske učinkovine (npr. proteina, npr. G-CSF).



Primeri

Analizne metode

Za analizo farmacevtskega pripravka, ki je predmet izuma, smo uporabili naslednje metode: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z ločevanjem po velikosti (SE-HPLC), HPLC z obrnjeno fazo (RP-HPLC), denaturirajočo analizo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE) ter merjenje *in vitro* biološke aktivnosti.

SE-HPLC

SE-HPLC smo uporabili za določevanje koncentracije G-CSF agregatov, predvsem dimerov in višjih agregatov. Meja detekcije za določevanje dimer in višjih agregatov je 0.01%.

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) sestavljajo: UV detektor, degazer, binarna črpalka in thermostatiran avtomatski sistem za vzorčevanje (e.g. Waters Alliance HPLC systems). Analiza je bila narejena pri naslednjih pogojih:

Kromatografski pogoji:

Kolona: TSK G3000 SW, 10 μ m, 300 x 7,5 mm ID

Temperatura kolone: 30 °C

Mobilna faza: fosfatni pufer pH 7.0 (5 mM natrijev fosfat, 50 mM NaCl)

Pretok: 0,8 ml/min, izokratski način

Detekcija: UV-Detektor, Valovna dolžina 215 nm.

Volumen injeciranja: 20 μ l (količina injeciranega proteina: 6-12 μ g)

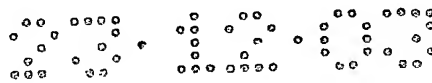
Temperatura avtomatskega sistema za vzorčevanje: +2 to + 8°C

Čas: 20 min

RP-HPLC

RP-HPLC smo uporabili za določevanje vsebnosti G-CSF in za kvantitativno določanje nečistoč, ki se ločijo glede na stopnjo hidrofobnosti.

HPLC system sestavljajo: UV detektor, degazer, binarna črpalka and thermostatiran termostat za kolono avtomatskega sistema za vzorčevanje (npr. Waters Alliance HPLC systems). Analiza je bila izvedena pri naslednjih pogojih: Kromatografski pogoji:



Kolona: YMC-Pack ODS-AQ, 200 Å, sferična, 3 µm, 150 x 4.6 mm i.d.

Temperatura kolone: 65°C

Mobilna faza: Faza A: 0.1% trifluoro ocetna kislina (TFA) and 50% acetonitril (ACN) v vodi

Faza B: 0.1% TFA and 95% ACN v vodi za HPLC

Pretok: 1.0 mL/min, gradient:

Čas [min]	Mobilna faza B [%]
0.0	8
4.0	8
19.0	28
19.1	100
21.0	100
21.1	8
25.0	8

Detekcija: UV-Detektor, Valovna dolžina 215 nm.

Volumen injiciranja: 10 µL (injicirana količina proteina: 3-6 µg)

Temperatura avtomatskega sistema za vzorčevanje: +2 to + 8°C

Čas analize: 25 min

SDS-PAGE

SDS-PAGE smo uporabili za vizualno detekcijo prisotnosti proteinskih dimmer in drugih agregiranih oblik (trimer in oblik z visokimi molekulskimi masami)

Vzorci za nanos so bili pripravljeni v vzorčnem pufru brez reducenta. Uporabili smo vertikalno SDS-PAGE, gel NuPAGE Bis-Tris 12%, 8 x 8 cm, debeline 1.0 mm, 15 žepkov (Invitrogen) in MOPS SDS pufer za elektroforezo (Invitrogen). Elektroforezo je tekla 1 uro pri konstantni napetosti 200 V. Vzorce smo obarvali s Comassie blue (0.1% Phast Gel Blue R 350 v 30% metanolu).

Testiranje biološke aktivnosti G-CSF in vitro

Biološko aktivnost G-CSF smo določali z metodo proliferacije na celični liniji NFS-60 po znani metodi (Hammerling, U. s sodelavci v *J Pharm Biomed Anal* 13, 9-20 (1995)) in uporabi mednarodnega standarda Human recombinant G-CSF (88/502,



yeast cell derived; NIBSC Potters Bar, Hertfordshire, UK); (Mire-Sluis, A.R. s sodelavci v *J Immunol Methods* 179, 117-126 (1995)).

Merjenje pH vrednosti

pH smo merili z uporabo MA 5741 (Iskra) pH metra in Biotrode (Hamilton) elektrode. pH meter smo umerili na območje pH med 3.0 in pH 5.0 z ustreznimi svežimi kalibracijskimi pufri. pH smo merili pri temperaturi 25°C. Standardna deviacija pH meritve je 0.003 pH vrednosti (0.3%).

Pogoji za testiranje G-CSF stabilnosti v farmacevtskih pripravkih

4 °C: shranjeno v hladilniku pri temperaturi hladilnika (v območju od +4 °C do +6°C)

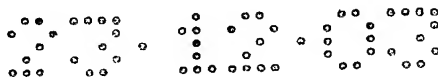
40°C: shranjeno pri 40 °C ± 2°C

25°C: shranjeno pri sobni temperaturi med 25°C in 30°C v 1 ml napolnjene brizge med stresanjem pri 75 RPM na stresalniku Vibromix 314EVT.

Primer 1: Testi stabilnosti

Pripravili smo naslednje tekoče farmacevtske pripravke:

FP1	0,3 mg/ml G-CSF, 39 mM NDSB, 5 mM Na EDTA, pH 4.4
FP2	0,3 mg/ml G-CSF, 39 mM NDSB, 5 mM Na EDTA, 5% DMSO pH 4.4
FP3	0,3 mg/ml G-CSF, 7 mM NDSB, 5% sorbitol, pH 4.4
FP4	0,6 mg/ml G-CSF, 6 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4.6
FP5	0,6 mg/ml G-CSF, 13 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4.3
FP6	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4.5
FP7	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 5% sorbitol, pH 4.4
FP8	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 10% sorbitol, pH 4.4
FP9	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 8% inozitol, pH 4.4
FP10	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 8% trehaloza, pH 4.4
FP11	0,6 mg/ml G-CSF, 50 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4.9



▪ Referenčni farmacevtski pripravek:

A (S16-10ACT): 0.3 mg/ml G-CSF, 10 mM očetna kislina, 5% (m/v) sorbitol, 0.004% Tween 80, pH uravnan na 4.0 z NaOH (ista sestava kot Neupogen)

Vzorci s koncentracijo G-CSF 0.6 mg/ml so bili shranjeni pri 40°C 1 mesec. Vzorce smo analizirali z uporabo SE-HPLC; nanos G-CSF na kolono je bil 6 µg. Rezultati so predstavljeni na Sliki 1 (AU = enota absorpcije).

Legenda Slike 1:

- | | |
|---|-----------|
| 1 | FP1 |
| 2 | FP2 |
| R | S16-10ACT |

Vzorci s koncentracijo G-CSF 0.6 mg/ml so bili shranjeni pri 40°C 1 mesec. Vzorce smo analizirali z uporabo SE-HPLC; nanos G-CSF na kolono je bil 6 µg. Rezultati so predstavljeni na Sliki 2 (AU = enota absorpcije).

Legenda Slike 2:

- | | |
|---|-----|
| 4 | FP4 |
| 5 | FP5 |
| 9 | FP9 |

Rezultati testov stabilnosti

SE-HPLC analiza vzorcev FP1 in FP2, shranjenih 1 mesec pri 40°C, kaže, da so vzorci stabilni, saj ni opaznega povečanja vsebnosti agregatov in hidrofobnih razkrojnih produktov (Tabela 1, Slika 1). Stabilnost je primerljiva z referenčnim vzorcem (AS16-10ACT), ki je identičen farmacevtskemu pripravku, ki vsebuje G-CSF in je prisoten na trgu (Neupogen, G-CSF = 0.3 mg/ml). Stabilnost je bila potrjena tudi z RP-HPLC analizami, ki ne kažejo bistvenih sprememb v nečistočah ali vsebnosti proteina po času hranjenja. Ti rezultati se skladajo z rezultati po SDS-PAGE analizi

(rezultati niso prikazani) in merjenju *in vitro* biološke aktivnosti. *In vitro* biološka aktivnost G-CSF, ki je bil uporabljen v študijah, je bila na nivoju mednarodnega standarda (Cat. No. 88/502; NIBSC, UK). Po hranjenju pod pogoji študije se *in vitro* biološka aktivnost vzorcev FP1 in FP2 ni spremenila (rezultati niso prikazani).

Tabela 1

	NDSB	pH	Pomožna snov	Čas shranjevanja	Temperatura	Dimere (SE-HPLC)	Višji agregati (SE-HPLC)
AS16-10ACT c = 0,3 mg/ml	-	4.0	Tween 80 sorbitol	1 m	40°C	0.00%	0.13%
FP1	39 mM	4.4	EDTA	1 m	40°C	0.00%	0.18%
FP2	39 mM	4.4	EDTA DMSO	1 m	40°C	0.00%	0.23%
FP3	7 mM	4.4	sorbitol	1 m	40°C	0.00%	1,02%

m: mesec; %: količina dimer/višjih agregatov glede na celotno količino G-CSF; c = G-CSF koncentracija

Rezultati kažejo, da so farmacevtski pripravki, ki vsebujejo NDSB, primerljivo stabilni z referenčnim vzorcem (AS16-10ACT). Višje koncentracije NDSB kažejo ugodnejši vpliv na stabilnost.

SE-HPLC analiza vzorcev od FP4 do FP11, shranjenih 1 teden in 1 mesec pri 25°C kaže, da so vzorci stabilni, saj ni bilo opaznega povečanja vsebnosti agregatov in hidrofobnih razkrojnih produktov (Tabela 2, Slika 2). Stabilnost je bila primerljiva z referenčnim vzorcem (AS16-10ACT), ki je identičen farmacevtskemu pripravku, ki vsebuje G-CSF in je prisoten na trgu (Neupogen, G-CSF = 0.3 mg/ml). Stabilnost je bila potrjena tudi z RP-HPLC analizami, ki ne kažejo bistvenih sprememb v nečistočah ali vsebnosti proteina po času hranjenja. Ti rezultati se skladajo z rezultati po SDS-PAGE analizi (rezultati niso prikazani) in merjenju *in vitro* biološke aktivnosti. *In vitro* biološka aktivnost G-CSF, ki je bil uporabljen v študijah, je bila na nivoju mednarodnega standarda (Cat. No. 88/502; NIBSC, UK). Po hranjenju pod pogoji študije se *in vitro* biološka aktivnost vzorcev FP4 in FP11 ni spremenila (rezultati niso prikazani).

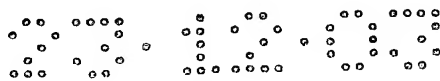


Tabela 2

Vzorec	pH	Pomožna snov	Čas shranjevanja	Temperatura	Dimeri (SE-HPLC)	Višji agregati (SE-HPLC)	Vsebnost proteina (RP-HPLC)
FP4 6 mM NDSB	4.6	sorbitol 8%	1 t	40°C	0.07%	0.21%	99.4%
			1 m	40°C	0.00%	1,8%	95.3%
			1 t	25°C	0.03%	0.07%	99.6%
			stresanje				
FP5 13 mM NDSB	4.3	sorbitol 8%	1 t	40°C	0.10%	0.18%	96.5%
			1 m	40°C	0.00%	1,63%	93.9%
			1 t	25°C	0.00%	0.07%	97.4%
			stresanje				
FP6 6 mM NDSB	4.5	sorbitol 8%	1 t	40°C	0.13%	0.18%	98.8%
			1 m	40°C	0.00%	1.82%	96.0%
			1 t	25°C	0.05%	0.07%	99.2%
			stresanje				
FP7 10 mM NDSB	4.4	sorbitol 5%	1 t	40°C	0.18%	0.17%	98.6%
			1 m	40°C	0.00%	1,18%	95.1%
			1 t	25°C	0.02%	0.04%	99.4%
			stresanje				
FP8 10 mM NDSB	4.4	sorbitol 10%	1 t	40°C	0.11%	0.18%	98.4%
			1 m	40°C	0.00%	1,9%	95.8%
			1 t	25°C	0.03%	0.08%	99.6%
			stresanje				
FP9 10 mM NDSB	4.4	inozitol 8%	1 t	40°C	0.10%	0.09%	98.4%
			1 m	40°C	0.00%	0,97%	95.6%
			1 t	25°C	0.16%	0.08%	99.4%
			stresanje				
FP10 10 mM NDSB	4.4	trehaloza 8%	1 t	40°C	0.35%	0.25%	98.4%
			1 m	40°C	0.00%	2,08%	95.2%
			1 t	25°C	0.50%	0.11%	99.0%
			stresanje				
FP11 50 mM NDSB	4.9, pH z NaOH	sorbitol 8%	1 t	40°C	0.16%	0.05%	97.0%
			1 m	40°C	0.14%	0.85%	89.1%
			1 t	25°C	0.05%	0.05%	99.1%
			stresanje				

t: teden, m: mesec; %: količina dimer/višjih agregatov glede na celotno količino G-CSF; %poliol: m/v

Rezultati iz Tabele 2 kažejo, da so farmacevtski pripravki z dodatkom NDSB stabilni. Rahel padec stabilnosti glede na referenčni vzorec (Tabela 1) smo opazili pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni bolj ekstremnim pogojem (1 mesec, 40°C). Možno je tudi, da je rahel padec stabilnosti posledica dejstva, da je pH nad 4.0 neugoden za G-CSF, kar je razvidno tudi iz stanja tehnike. Referenčni vzorec je bil pripravljen pri pH 4.0.

Primer 2

Sestava inventivnih farmacevtskih pripravkov G-CSF

Sestave inventivnih farmacevtskih pripravkov so predstavljene v Tabeli 3.

Tabela 3

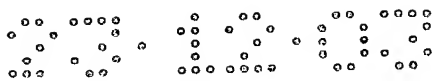
Vzorec	G-CSF vsebina (mg/ml)	Inaktivne sestavine	pH
FP1	0.3	39mM NDSB, 5 mM Na EDTA, 5% DMSO	4.4
FP2	0.3	39 mM NDSB, 5 mM Na EDTA	4.4
FP3	0.3	7 mM NDSB, 8% sorbitol	4.4
FP4	0.6	6 mM NDSB, 8% sorbitol	4,6
FP5	0.6	13 mM NDSB, 8% sorbitol	4.3
FP6	0.6	10 mM NDSB, 8% sorbitol	4.5
FP7	0.6	10 mM NDSB, 5% sorbitol	4.4
FP8	0.6	10 mM NDSB, 10% sorbitol	4.4
FP9	0.6	10 mM NDSB, 8% inozitol	4.4
FP10	0.6	10 mM NDSB, 8% trehaloza	4.4

Priprava bulk koncentrata

Izhodni G-CSF za pripravo bulk koncentrata, je bil pridobljen z ekspresijo v *E. coli*. Bulk koncentrat je bil pripravljen v raztopini s čisto kislino (ocetno ali HCl) pri pH 4.4 pri koncentraciji G-CSF 1.5 mg/ml. SE-HPLC analiza bulk koncentrata je pokazala, da je bila vsebnost dimer in višjih agregatov pod mejo detekcije. Vsebnost nečistot določenih z RP-HPLC analizo je bila v območju med 2-4%. (Analiza RP-HPLC svežega vzorca Neupogena je pokazala primerljiv nivo nečistot).

Kvaliteta substanc:

NDSB: NDSB-195 (Calbiochem) za analizo, sorbitol: Ph Eur kvaliteta; glicerol: Merck; za analizo; inozitol: myo-inositol (Fluka: > 99.5% HPLC), trehaloza (Fluka: > 99.5% HPLC), EDTA (Sigma: 99%), DMSO (Merck: > 99.5%), Tween 80 (Sigma, nizek nivo



peroksidov, vsebuje BHT kot antioksidant); voda za injekcije: Ph Eur quality; voda za analizo: Milli-Q (Millipore)

Priprava referenčnega farmacevtskega pripravka

A (S16-10ACT): Frakcije gelske filtracije, ki so vsebovale monomerni G-CSF, smo združili in zamenjali s pufram, ki je vseboval 10 mM očetno kislino ter 5% sorbitol v vodi za injekcije. pH pufra je bil uravnan z raztopino NaOH na 3.96. Zamenjavo smo izvedli na Labscale TM TFF System/Millipore ob uporabi treh membran Ultracel- 5 PLCCC. Tween 80 smo dodali do koncentracije 0,004%. pH končne raztopine po zamenjavi je bil 4.0, s koncentracijo 0.304mg/ml

Priprava inventivnih farmacevtskih pripravkov:

Splošno:

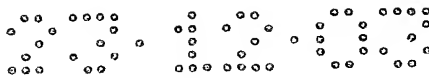
Inventivne farmacevtske pripravke smo pripravili z redčenjem bulk koncentrata z ustrezno sterilno pufrsko raztopino, ki je bila predhodno filtrirana skozi 0.2 PES/Nalgene filter. Končna koncentracija G-CSF je bila 0.3 mg/ml oziroma 0.6 mg/ml.

Pri FP1 in FP2 smo raztopine farmacevtskih pripravkov napolnili v 2 ml vialle iz brezbarvnega cevne stekla I. hidrolitske skupine oprane in sterilizirane in jih zaprli s čepi iz brombutil kaučuka in z aluminijastimi zaporkami.

Pri vseh ostalih raztopinah farmacevtskih pripravkov (FP3 do FP11) pa smo napolnili (ročno) injekcijske brizge (volumen 1,3 - 1,4 ml), tako, da je bilo ob čepu čim manj zraka.

FP1, FP2, FP3: 1 delu bulk koncentrata smo dodali 4 dele raztopine ustreznega pufra. Dobili smo končne koncentracije, ki so navedene v Tabeli 3. pH nismo več uravnavali.

FP4 – FP11: 4 delom koncentrata smo dodali 6 delov raztopine ustreznega pufra. Dobili smo končne koncentracije, ki so navedene v Tabeli 3. pH nismo več uravnavali.

**Patentni zahtevki**

1. Farmacevtski pripravek, označen s tem, da vsebuje terapevtsko količino farmacevtsko aktivne učinkovine in NDSB.
2. Farmacevtski pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da je farmacevtsko aktivna učinkovina izbrana iz skupine, ki zajema sintetske ali naravne organske molekule in proteine, ki so izbrani iz skupine, ki zajema granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik, interferone, interleukine, granulocitni makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik, makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik, epidermalni rastni faktor, eritropoietin, folikle-stimulirajoči hormon, človeški serumski albumin, deoksiribonukleazo, fibroblastni rastni faktor, dejavnik tumorske nekroze alfa, dejavnik tumorske nekroze beta, kalcitonin, hematoprotein, plazminogenske aktivatorje in njihove prekurzorje, citokine; družina TNF ligandov, topni receptorji, rastne hormone, lipoproteini, alfa-1-antitripsin; insulin, proinsulin, podenoto A insulina, podenoto B insulina; glukagoni, faktorje strjevanja krvi, bombazin, trombin; enkefalinazo; makrofagni inflamatorni protein (MIP-1-alfa); podenoto A relaksina, podenoto B relaksina, prorelaksin; inhibin; aktivin; vaskularni endotelijski rastni faktor; receptorji za hormone ali rastne faktorje; integrini; protein A, protein D, reumatoidni faktorji; neurotropni faktor iz kosti, neurotropin-3,-4,-5, ali -6, živčni rastni faktor, rastni faktor iz krvnih ploščic, fibroblastni rastni faktor, transformirani rastni faktor, insulinu-podobni rastni faktor, trombopoietin, kostni morfogogenetski protein in superoksid dismutazo.
3. Farmacevtski pripravek po zahtevku 2, označen s tem, da je izbrana farmacevtsko aktivna učinkovina terapevtsko učinkovita količina proteina.
4. Farmacevtski pripravek po zahtevku 3, označen s tem, da je izbrani protein terapevtsko učinkovita količina G-CSF.
5. Farmacevtski pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da je NDSB kvarterna amonijeva sol, kjer so na centralni dušik vezane skupine R1, R2, R3 in R4-SO₃, pri čemer je:

R1 = metil, etil, propil, butil, pentil, heksil;

R2 = metil, etil, propil, butil, pentil, heksil;



R3= metil, etil, propil, butil, pentil, heksil, in vse kombinacije treh radikalov R1, R2 in R3; R4= (CH₂)_n, n = od 1 do 6.

6. Farmacevtski pripravek po zahtevku 5, označen s tem, da je NDSB izbran iz skupine, ki zajema dimetiletil-(3-sulfopropil)-amonijevo sol, 3-(1-metilpiperidin)-1-propan sulfonat, 3-(1-piridino)-1-propan sulfonat, dimetilbenzilamonijev propan sulfonat in (dimetil-t-butil-(3-sulfopropil) amonijeva sol).
7. Farmacevtski pripravek po zahtevku 6, označen s tem, da je izbrani NDSB dimetiletil-(3-sulfopropil)-amonijeva sol.
8. Farmacevtski pripravek po zahtevkih od 1 do 7, označen s tem, da opsijsko nadalje vsebuje poliol.
9. Farmacevtski pripravek po zahtevku 8, označen s tem, da je poliol izbran iz skupine, ki zajema sorbitol, glycerol, inozitol, trehalozo in manitol.
10. Farmacevtski pripravek po zahtevkih od 1 do 9, označen s tem, da opsijsko nadalje vsebuje eno ali več farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi.
11. Farmacevtski pripravek po zahtevku 10, označen s tem, da je farmacevtsko sprejemljiva pomožna snov izbrana iz skupine, ki zajema EDTA in DMSO.
12. Postopek za pripravo farmacevtskega pripravka, označen s tem, da se s postopkom pripravi katerikoli farmacevtski pripravek po zahtevkih od 1 do 11.
13. Uporaba farmacevtskega pripravka po kateremkoli prejšnjem zahtevku za pripravo zdravil za zdravljenje bolezni, ki so indicirane za proteine po zahtevku 2.
14. Uporaba farmacevtskega pripravka po kateremkoli prejšnjem zahtevku za pripravo zdravil za zdravljenje bolezni, ki so indicirane za G-CSF.
15. Uporaba farmacevtskega pripravka po kateremkoli prejšnjem zahtevku za zdravljenje bolezni, ki so indicirane za proteine po zahtevku 2.
16. Uporaba farmacevtskega pripravka po kateremkoli prejšnjem zahtevku za zdravljenje bolezni, ki so indicirane za G-CSF.

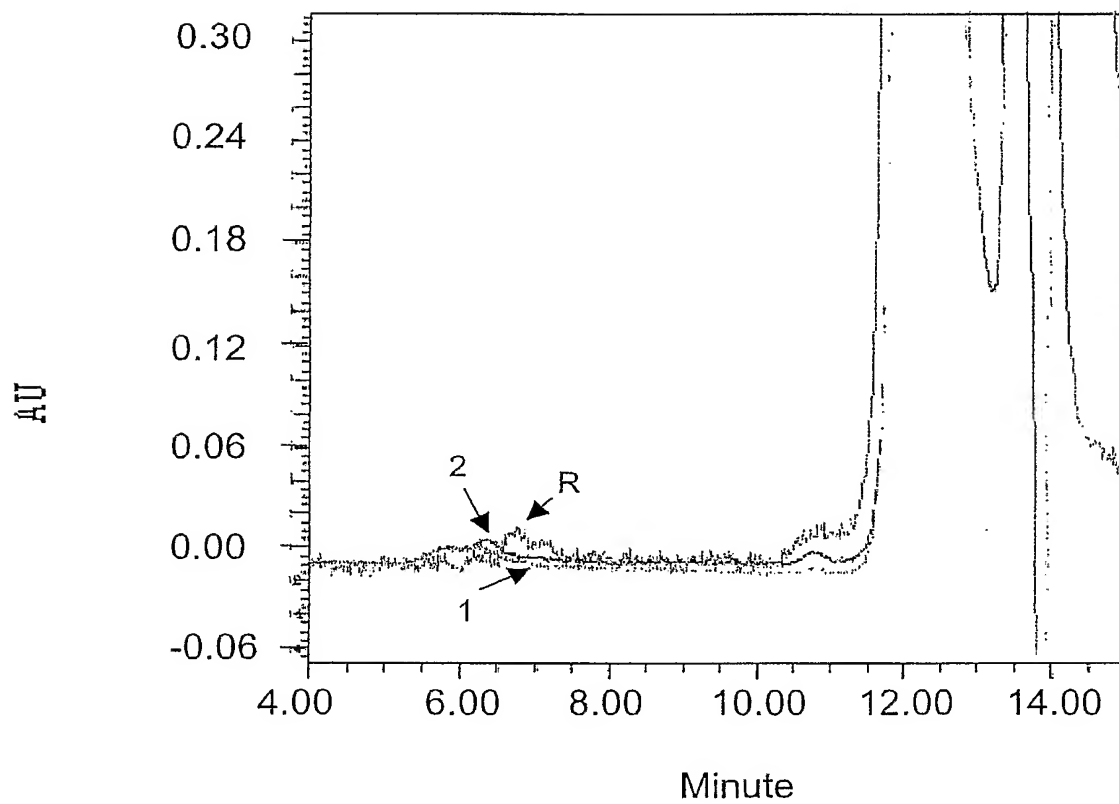
Izvleček

Predloženi izum se nanaša na farmacevtski pripravek, ki vsebuje nemicelarne sulfobetaine (NDSB).

30-10-03

1/2

Slika 1



03.12.03

2/2

Slika 2

